

ویژگی های فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه های *Erwinia amylovora* از میزبان های مختلف در شیراز

شهرزاد توکل باخدا^۱ و سید محسن تقوی^{۲*}
۱، ۲، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز
(تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۲۹ - تاریخ تصویب: ۸۹/۷/۷)

چکیده

از اواخر فروردین سال ۱۳۸۵ تا شهریور سال ۱۳۸۶ باغات میوه مناطق مختلف شیراز مورد بازدید قرار گرفتند و از درختان سیب، به و گلابی دارای علائم سوختگی آتشی نمونه برداری شد. تعداد چهل و هفت جدایه باکتری با استفاده از محیط کشت های آگار غذایی از بافت های آلوده جدا و براساس آزمون های استاندارد باکتری شناسی به عنوان *Erwinia amylovora* تشخیص داده شدند. جدایه ها از نظر خصوصیات فنوتیپی، بیماری زایی، اندازه قطعات DNA تکثیر شده در حضور آغازگر اختصاصی A/B در واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) و تنوع نقوش حاصل از محصولات واکنش rep-PCR با سه آغازگر REP، ERIC و BOX مورد مقایسه قرار گرفتند. کلیه جدایه ها گرم منفی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و بی هوازی اختیاری بودند. روی محیط کشت آگار غذایی پرگنه های براق، گرد، محدب و کرم رنگ و روی محیط CCT پرگنه های آبی کم رنگ، براق با حاشیه مشخص ایجاد کردند. جدایه ها قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت در توتون، تولید لوان، ذوب ژلاتین، تولید استوئین و تولید مواد احیاء کننده از ساکاروز بودند ولی هیچ یک از جدایه ها قادر به تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کشت YDC، هیدرولیز توئین، هیدرولیز ژلاتین، تولید لستیناز، رشد در ۳۹ درجه سلسیوس و تولید اوره آز نبودند. اکثر جدایه ها در آزمون تصاعد گاز از گلوکز واکنش مثبت نشان دادند. در مایه زنی روی نهال های سیب، به و گلابی علائم خشکیدگی در برگ ها و سرعصایی شدن دم برگ ها پس از سه هفته ایجاد شد و در مایه زنی میوه های نارس گلابی لکه های قهوه ای تا سیاه در اطراف ناحیه مایه زنی شده ایجاد گردید. در آزمون PCR، تمام جدایه ها که بر اساس آزمون های باکتری شناسی و بیماری زایی به عنوان *E. amylovora* تشخیص داده شده بودند با جفت آغازگر اختصاصی A/B قطعه قابل انتظار ۱۰۰۰ جفت بازی را تولید کردند. در واکنش rep-PCR یازده جدایه نماینده که بر اساس آزمون های باکتری شناسی، بیماری زایی و واکنش زنجیره ای پلی مرز به عنوان *E. amylovora* تشخیص داده شده بودند قطعات متفاوتی از لحاظ اندازه تولید کردند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری داده ها نشان دهنده همگن بودن جدایه های این باکتری از میزبان های مختلف می باشد.

واژه های کلیدی: *Erwinia amylovora*، سوختگی آتشی، سیب، گلابی، به.

مقدمه

بیماری آتشک سیب و گلابی و به از بعد تاریخی و پراکنش جهانی، از مهم‌ترین و مهلک‌ترین بیماری‌های درختان میوه دانه‌دار به‌شمار می‌رود. این بیماری که به طور پیوسته اما پراکنده در باغات ظهور می‌کند، خسارت‌های سنگین و غیرقابل جبرانی به باغات و محصولات باغی وارد می‌سازد (Vander Zwet & Bonn, 1991). اگرچه این بیماری یکی از بیماری‌های مهم درختان سیب (*Malus spp.*)، گلابی (*Pyrus spp.*)، به *Cydonia spp.* و برخی گیاهان زینتی چوبی محسوب می‌شود ولی باکتری عامل این بیماری قادر است بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی متعلق به ۴۰ جنس از خانواده گلسرخیان (*Rosaceae*) و عمدتاً زیر خانواده (*Maloideae*) را آلوده نماید. با این حال سیب، گلابی، زالزالک، به، پیراکانتا، شیرخشت و سماق کوهی به‌عنوان مهم‌ترین میزبان‌های این بیماری گزارش شده‌است (Vander Zwet & Keil, 1979).

عامل این بیماری *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow *et al.* یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل و متعلق به خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد. یکی از ویژگی‌های مهم این بیمارگر این‌است که مشخصات و صفات آن در تمام نقاط دنیا یکسان و یکنواخت است، به‌عبارت دیگر در بین جدایه‌های این باکتری به‌رغم این که از چه میزبانی جدا شده‌اند تفاوت چندانی وجود ندارد. انگشت‌نگاری ژنتیکی ۱۸۹ جدایه از *E. amylovora* که از میزبان‌های مختلف در مناطق میوه کاری شمال آمریکا، نیوزلند و کانادا جمع‌آوری شده بود، به کمک rep-PCR بیان‌گر این نکته می‌باشد، چون ۸۷٪ از این جدایه‌ها همگونی ۹۶-۹۹٪ نشان‌دادند (McManus & Jones, 1995). همچنین انگشت‌نگاری ژنتیکی ۹۳ جدایه از *E. amylovora* که از کشورهای مختلف به دست آمده بود نیز چند شکلی بسیار پایینی را نشان داد (Rico *et al.*, 2008).

در ایران بیماری سوختگی آتشی تا قبل از سال ۱۳۶۸ به‌عنوان بیماری قرنطینه‌ای مطرح بود اما اکنون به‌عنوان مهم‌ترین بیماری روی درختان میوه دانه‌دار مثل گلابی و به در سطح باغات کشور در حال گسترش است (Ashkan, 2006). این بیماری اولین بار، در بهار

۱۳۶۸ از گل‌ها و برگ‌های سوخته گلابی از منطقه برغان کرج توسط Zakeri & Sharifnabi (1991) جمع‌آوری و شناسایی شد. Mazarei *et al.* (1994) وضعیت این بیماری را روی درختان میوه دانه‌دار در استان‌های آذربایجان غربی و قزوین مورد بررسی قرار دادند. و روش سرولوژیکی را جهت شناسایی باکتری *E. amylovora* عامل بیماری سوختگی آتشی سیب و گلابی به‌کار بردند (Mazarei *et al.*, 1993). Rahimian (1996) جدایه‌های ایرانی *E. amylovora* به دست آمده از درختان میوه دانه دار مبتلا به بیماری سوختگی آتشی را از لحاظ خصوصیات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و الکتروفورز پروتئین با هم مقایسه کردند. Sahandpour & Ghasemi (2004) علایم بیماری سوختگی آتشی را در یکی از باغات شیراز روی درختان به پیوند شده روی پایه کیالک و نیز گلابی مشاهده کردند و با توجه به بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیک جدایه‌ها، باکتری عامل بیماری تشخیص داده شد.

در نمونه‌های سیب، گلابی و به که از اواخر فروردین ماه تا شهریور ماه ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ از نقاط مختلف شهر شیراز به بخش گیاه‌پزشکی دانشگاه شیراز منتقل گردید علایم خشکیدگی شکوفه‌ها، قهوه‌ای شدن رگبرگ‌ها و بافت اطراف آن، آویزان شدن برگ‌ها و میوه‌های نارس و بروزشانکر و ترشحات صمغی در تنه درختان مشاهده گردید. با توجه به پیشرفت این بیماری در ایران و وقوع آن در استان فارس، تحقیق حاضر با اهداف جداسازی و تشخیص عامل بیماری سوختگی آتشی درختان میوه دانه‌دار روی میزبان‌های مختلف بر اساس آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، بیماری‌زایی و مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، بررسی دامنه میزبانی و بیماری‌زایی عامل بیماری روی میزبان‌های مختلف متعلق به خانواده رزاسه و تعیین تنوع ژنوتیپی جدایه‌های به‌دست آمده از میزبان‌های مختلف با استفاده از rep-PCR صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی

از اواخر فروردین ماه ۱۳۸۵ تا شهریور ماه ۱۳۸۶

بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها

تعداد چهل و هفت جدایه جمع‌آوری شده از میزبان‌های مختلف در مناطق مختلف شیراز که دارای پرگنه‌های براق، گرد، محدب و کرم روی محیط NA و پرگنه‌های آبی کم‌رنگ، براق با حاشیه مشخص روی محیط کشت CCT، گرم منفی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، بی‌هوازی اختیاری و قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت در توتون بودند، به‌عنوان نماینده انتخاب بر آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای بر اساس روش‌های استاندارد باکتری شناسی گیاهی روی آنها انجام شد (Dye, 1968; Fahy & Persley 1983; Hugh & Leifson, 1953; Schaad *et al.*, 2001; Klement *et al.*, 1964).

اثبات بیماری‌زایی

تعدادی نهال یک تا دو ساله سیب، به و گلابی تهیه و به گلدان‌های سفالی بزرگ حاوی خاک بکر رسی- شنی منتقل و در گلخانه بخش گیاه‌پزشکی نگهداری شدند. از کشت ۴۸ ساعته جدایه‌ها روی محیط کشت آگار غذایی سوسپانسیون با غلظت 10^8 cfu/ml (چگالی نوری ۱/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر- اسپکترو فتومتر مدل Spekol) در آب مقطر سترون تهیه و دو میلی‌لیتر آن با یک سرنگ پنج میلی‌لیتری از طریق رگبرگ اصلی به برگ‌های نهال‌های سیب، گلابی و به تزریق شد. برای حفظ رطوبت، کل برگ‌ها به مدت دو روز با تعدادی کیسه نایلونی بزرگ رنگ روشن پوشانده شد. در تیمارهای شاهد به جای سوسپانسیون باکتری از آب مقطر سترون استفاده شد (Ritchie & Klos, 1974; Schaad *et al.*, 2001). ظهور علائم و نحوه پیشرفت بیماری تا حدود سه ماه مورد بررسی قرار گرفت.

میوه‌های نارس گلابی پس از شستشو و ضد عفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد، در شرایط آزمایشگاهی با سوسپانسیون باکتری با غلظت تقریبی 10^8 cfu/ml مایه‌زنی گردیده و به مدت یک هفته در دمای 25°C و رطوبت ۶۰٪ نگهداری شدند (Schaad *et al.*, 2001).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) جهت تشخیص

عامل بیماری

از کشت ۴۸-۲۴ ساعته چهل و هفت جدایه به دست آمده از مناطق مختلف شیراز، در آب مقطر سترون

باغات میوه واقع در مناطق مختلف شیراز شامل بلوارچمران، شهر صدرا، خوابگاه ارم و باجگاه (دانشکده کشاورزی) مورد بازدید قرار گرفتند و از درختان سیب، به و گلابی دارای علائم سوختگی آتشی نمونه‌برداری و درون کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شدند.

برای جداسازی عامل بیماری، با استفاده از یک قیچی باغبانی سترون قطعاتی از مرز بافت‌های سالم و آلوده بدون ضدعفونی سطحی جدا گردید. ده گرم بافت آلوده در یک ازلن سترون حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون و یک درصد پپتون به مدت یک‌ساعت روی دستگاه تکان‌دهنده با ۶۰ حرکت رفت و برگشت در دقیقه قرار داده شد. سوسپانسیون به دست آمده با استفاده از لوپ و به‌روش خطی روی محیط کشت آگار غذایی (NA) کشت داده شد و تست‌ها در دمای اتاق نگهداری شدند. بعد از ۲۴-۴۸ ساعت، تک پرگنه‌های کوچک، براق، به رنگ کرم تا شیری با حاشیه صاف به شکل گرد و محدب انتخاب و برای خالص‌سازی، دوباره روی محیط کشت NA به صورت مخطط کشت داده شدند. جدول ۱ نشان‌دهنده منشأ و مشخصات جدایه‌ها می‌باشد.

جدول ۱- میزبان و منشأ جدایه‌های عامل بیماری سوختگی آتشی درختان میوه دانه‌دار جدا شده از مناطق مختلف شیراز

نام جدایه	میزبان*	محل نمونه‌برداری
Q3 تا Q56	به	بلوار چمران
Q61 تا Q64	به	محوطه دانشکده کشاورزی
Q71 و Q72	به	محوطه خوابگاه ارم
Q81 تا Q88	به	بلوار چمران
Q91 تا Q93	به	شهر صدرا
Q101 تا Q103	به	بلوار چمران
A11 تا A14	سیب	بلوار چمران
A2	سیب	محوطه دانشکده کشاورزی
A41 تا A43	سیب	بلوار چمران
A51 و A52	سیب	شهر صدرا
P11 تا P17	گلابی	محوطه دانشکده کشاورزی
P21 و P22	گلابی	بلوار چمران
P3	گلابی	شهر صدرا

* A: جدایه‌های به دست آمده از درخت سیب، P: جدایه‌های به دست آمده از درخت گلابی و Q: جدایه‌های به دست آمده از درخت (به)

۵۲°C برای آغازگر ERIC به مدت یک دقیقه و ۶۵°C به مدت ۸ دقیقه و واکنش انتهایی در دمای ۶۵°C به مدت ۱۶ دقیقه انجام شد (Versalovic *et al.*, 1991; Versalovic *et al.*, 1994).

ژل آگارز ۱٪ به روش Sambrook *et al.* (1989) تهیه شد. پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) ژل بر روی صفحه UV transilluminator مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از Gel documentation Standard Molecular Marker 100bp DNA Ladder (شرکت سیناژن، تهران) برای تعیین اندازه قطعات استفاده شد.

آنالیز داده‌ها

با استفاده از نرم‌افزار Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis system (Ntsys-pc version 2.02) فاصله ژنتیکی جدایه‌ها رسم گردید (Rohlf 2000). فاصله یا شباهت ژنتیکی بین افراد بر اساس مارکرهای ملکولی، به صورت وجود یا عدم وجود نوار در ژل تعیین شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش مراتبی (Hierarchical) Technique انجام و برای بررسی فاصله واقعی میان کلاسترها از روش (UPGMA) Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Average و ضریب تشابه Simple matching استفاده گردید (Rohlf 2000). خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی به صورت کدهای یک (برای خصوصیات مثبت) و صفر (برای خصوصیات منفی) در این نرم‌افزار تعریف گردید. بر پایه خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی داده شده به آن، دندروگرام مربوط به ۴۷ جدایه (برای خصوصیات فنوتیپی) و ۱۱ جدایه (برای خصوصیات ژنوتیپی) مورد بررسی، توسط این نرم‌افزار رسم گردید. درصد تشابه بین جدایه‌های موجود در گروه‌ها، بر اساس کلیه خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی انجام گرفته در این تحقیق، محاسبه گردید.

نتایج

علائم بیماری

طی بازدیدهای به‌عمل آمده از مناطق مختلف شیراز (از اواخر فروردین‌ماه ۱۳۸۵ تا شهریورماه ۱۳۸۶) علائم شبیه سوختگی آتشی درختان میوه دانه‌دار با شدت

سوسپانسیون‌هایی با غلظت 10^8 cfu/ml تهیه، به‌مدت ۱۰ دقیقه در لوله‌های اپندورف سترون جوشانده شدند. از سوسپانسیون مذکور به‌عنوان DNA قالب در واکنش PCR با آغازگر اختصاصی A/B (Bereswill *et al.*, 1992) دارای ترادف:

A: 5' CGG TTT TTA ACG CTG GG

B: 5' GGG CAA ATA CTC GGA TT

استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BioRad و با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر $10 \times$ PCR Buffer، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۱۰۰ ng از هر یک از آغازگرها، ۱/۲۵ میلی‌مولار dNTP و ۰/۵ واحد از Taq-DNA Polymerase (شرکت سیناژن، تهران) و ۲ میکرولیتر از DNA قالب و آب مقطر سترون انجام گرفت. چرخه گرمایی اولیه شامل ۲ دقیقه در ۹۳°C و ۳۷ چرخه شامل ۱ دقیقه در ۹۳°C، ۲ دقیقه در ۵۲°C و ۲ دقیقه در ۷۲°C بود و در آخر ۱۰ دقیقه در ۷۲°C برای طویل شدن رشته‌ها به کار برده شد (Bereswill *et al.*, 1992; Lecomte *et al.*, 1997).

آزمون rep-PCR

از کشت ۴۸-۲۴ ساعته ۱۱ جدایه (Q71, Q81, Q91, Q101, A11, A2, A41, A51, P11, P21, P3) آب مقطر سترون سوسپانسیونی با غلظت 10^8 cfu/ml تهیه و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در لوله‌های اپندورف سترون سانتریفوژ گردید سپس روش‌شین حذف و ته‌نشین در $200 \mu L$ آب مقطر سترون حل شده و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند. از سوسپانسیون مذکور به‌عنوان DNA قالب در واکنش rep-PCR با سه آغازگر اختصاصی ERIC 1R/ERIC2, REP 1R/REP 2I و BOX A1R 1991 (۲۸ و ۲۹) استفاده شد. واکنش rep-PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Biorad صورت پذیرفت. مقدار کل هر واکنش ۲۵ میکرولیتر و شامل ۲/۵ میکرولیتر از بافر $10 \times$ PCR، ۱/۲۵ میلی‌مولار dNTP، ۰/۵ میکرولیتر از Taq پلیمرز (شرکت سیناژن تهران) و ۱۰۰ نانوگرم از هر آغازگر بود. چرخه‌های دمایی مورد استفاده برای انجام واکنش rep-PCR شامل پنج دقیقه در ۹۵°C، ۳۰ چرخه با دمای ۹۴°C به مدت یک دقیقه، ۴۰°C برای آغازگر REP، ۵۳°C برای آغازگر BOX و

جدول ۲- خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌های *Erwinia amylovora* جدا شده از مناطق مختلف شیراز

درصد جدایه‌های مثبت	آزمون
۰	گرم
۰	اکسیداز
۱۰۰	کاتالاز
۱۰۰	رشد بی هوازی
۱۰۰	واکنش فوق حساسیت روی توتون
۱۰۰	تولید مواد احیاء کننده از ساکاروز
۲/۱۳	تولید اندول
۱۰۰	تولید استوتین
۰	احیاء نیترات
۱۰۰	تولید لوان
۱۰۰	تولید پرگنه های براق آبی روی CCT
۰	تولید رنگدانه ی فلورسنت روی KB
۰	تولید رنگدانه ی صورتی روی YDC
۸/۵۱	تولید رنگدانه ی سبز متالیک روی EMB
۰	رشد در ۳۹° C
۱۰۰	ذوب ژلاتین
۰	هیدرولیز ژلاتین
۰	هیدرولیز توئین ۸۰
۰	هیدرولیز نشاسته
۰	تولید لستیناز
۸۲/۹۸	تصادف گاز از گلوکز
۰	لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی
۰	تولید اسید از
۲۵/۵۳	آدونیتول
۶۸/۰۹	آرابینوز
۱۷/۰۲	آرابیتول
۴/۲۶	اتانول
۰	اینوزیتول
۱۰۰	تری هالوز
۸/۵۱	دولسیتول
۰	رافینوز
۰	رامنوز
۲۵/۵۳	زایلوز
۱۰/۶۴	سلوبیوز
۱۰۰	سوربیتول
۱۰۰	سوکروز
۱۰۰	گالاکتوز
۱۰۰	گلوکز
۱۲/۷۷	گلیسرول
۱۰۰	فروکتوز
۱۲/۷۷	لاکتوز
۰	مالتوز
۰	مانوز
۹۳/۶۲	مانیتول
۰	ملی بیوز
۳۱/۹۱	نشاسته
۰	استفاده از
۱۲/۷۷	اینولین
۰	تارتارات
۰	سرین
۱۰۰	سیترات
۹۱/۴۹	گلیسرین
۱۰۰	لاکتات

متفاوت مشاهده شد. این علائم شامل خشکیدگی شکوفه‌ها، قهوه‌ای شدن رگبرگ‌ها و بافت اطراف آن، آویزان شدن برگ‌ها و میوه‌های نارس و بروز شانکر و ترشحات صمغی در تنه درختان بود از درختان سیب، به و گلایی جدایه‌ای از باکتری گرم منفی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و بی‌هوازی اختیاری جدا گردید.

خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌ها

کلیه جدایه‌ها دارای رشد در شرایط بی‌هوازی، قادر به تولید لوان، ذوب ژلاتین، تولید استوتین، تولید مواد احیاء کننده از ساکاروز، تولید رنگدانه براق آبی روی محیط کشت CCT و همچنین القاء واکنش فوق حساسیت روی توتون بودند، ولی هیچ‌کدام قادر به تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کشت KB، احیاء نیترات، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، تولید رنگدانه صورتی روی محیط کشت YDC، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز توئین، هیدرولیز ژلاتین، تولید لستیناز، رشد در دمای ۳۹ درجه سلسیوس و تولید اوره‌آز نبودند.

کلیه جدایه‌های مورد بررسی از گلوکز و سوربیتول به‌عنوان منبع کربن استفاده کرده و قادر به تولید اسید از ساکاروز، فروکتوز، گالاکتوز، رایبوز، تری‌هالوز و مصرف سیترات و لاکتات بودند. مشخصات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌ها در جدول ۲ ذکر شده است.

آنالیز عددی ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها

بر اساس دندروگرام رسم شده (Rohlf, 2000) بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی ۴۷ جدایه به‌دست آمده از مناطق و میزبان‌های مختلف، پنج گروه مشخص شد که در آن جدایه‌های به‌دست آمده از منطقه باجگاه گروه‌های جداگانه‌ای را نسبت به سایر جدایه‌ها تشکیل دادند و جدایه A2 که از سیب باجگاه جدا شده بود به تنهایی یک گروه مستقل با شباهت ۸۱٪ نسبت به سایر جدایه‌ها ایجاد کرد. سایر جدایه‌ها با شباهت بیش از ۸۲/۵٪ در گروه‌های مختلف قرار گرفتند، جدایه‌های به دست آمده از یک میزبان و یک منطقه در یک گروه و یا در گروه‌های بسیار نزدیک به هم قرار گرفتند که دلیلی بر تشابه بالای جدایه‌های *E. amylovora* می‌باشد (Rohlf, 2000 Perombelon & Kelman, 1980). (شکل ۵).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

چهل و هفت جدایه که بر اساس مجموعه خصوصیات افتراقی آزمون‌های باکتری‌شناسی به عنوان *E. amylovora* تشخیص داده شده بودند در آزمون PCR و با جفت آغازگر اختصاصی A/B قطعه قابل انتظار حدوداً ۱۰۰۰ جفت‌بازی را تولید کردند (شکل ۱).

آزمون rep-PCR

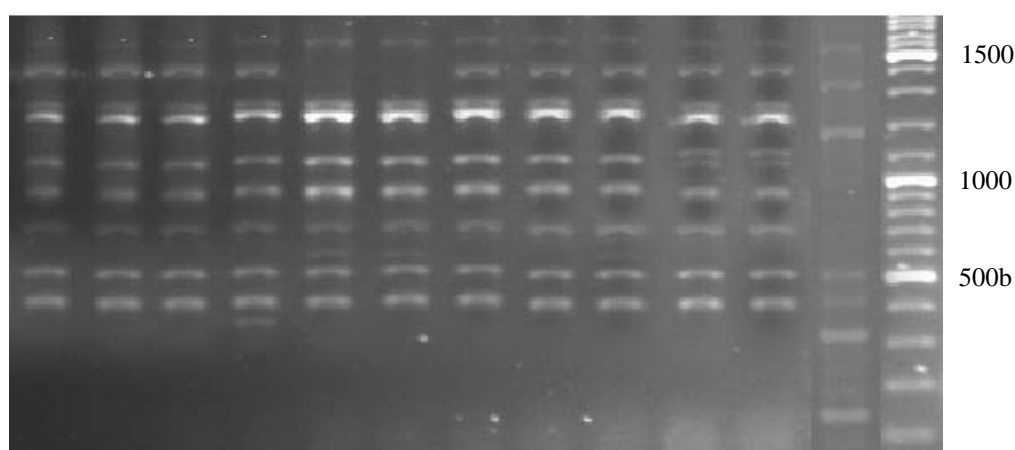
یازده جدایه نماینده (Q61, Q71, Q91, Q101, A11, A2, A41, A51, P11, P21, P3) که بر اساس مجموعه

خصوصیات افتراقی آزمون‌های باکتری‌شناسی و آزمون تشخیصی PCR با جفت آغازگر اختصاصی A/B به عنوان *E. amylovora* تشخیص داده شده بودند، در آزمون rep-PCR با سه آغازگر اختصاصی REP 1R/REP 2I، BOX A1R و ERIC 1R/ERIC 2 لحاظ اندازه تولید کردند (شکل ۲، ۳ و ۴).

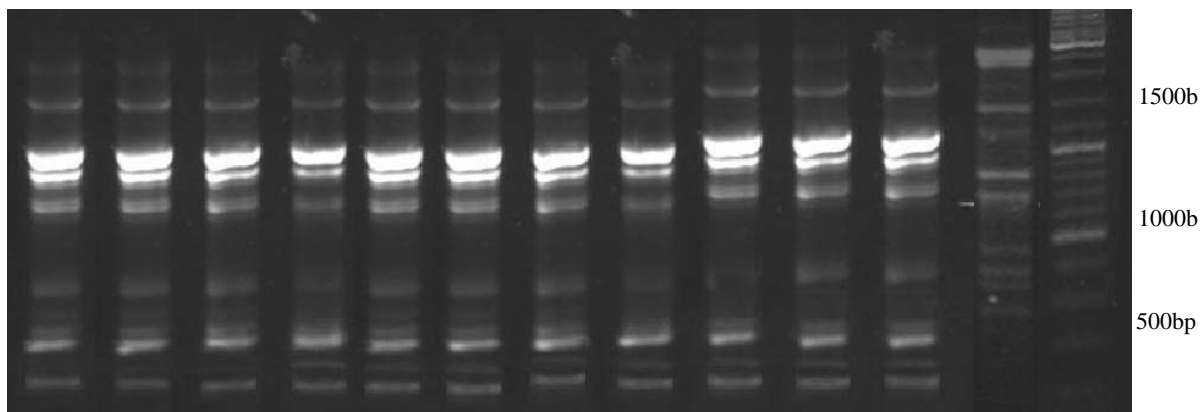
براساس دندروگرام رسم شده برای نقوش الکتروفورزی محصول rep-PCR با استفاده از آغازگر ERIC 1R/ERIC 2 دو گروه با شباهت ۹۴٪ مشخص



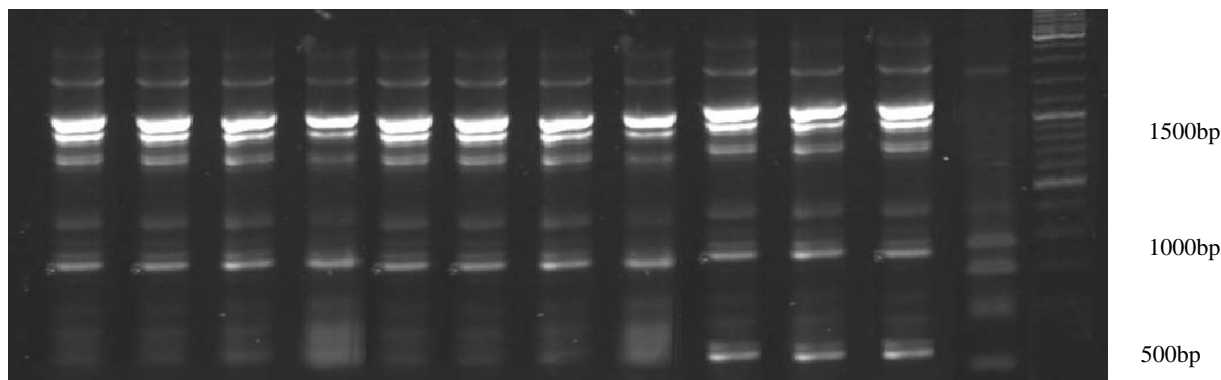
شکل ۱- نقوش الکتروفورزی محصول PCR با آغازگر اختصاصی A/B از راست به چپ: مارکر (Standard Molecular Marker 100bp DNA Ladder) آب مقطر سترون (کنترل منفی) جدایه‌های A2, A51, P3, A41, P11, Q71, Q91, Q101, A11, Q61, P21, A41.



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی محصول rep-PCR با آغازگر اختصاصی REP 1R/REP 2I از راست به چپ: نشانگر (Standard Molecular Marker 100bp DNA Ladder) جدایه *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* (کنترل منفی) جدایه‌های P3, A41, Q91, A2, P21, Q61, A51, P11, A11, Q101, Q71.



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصول rep-PCR با آغازگر اختصاصی BOX A1R از راست به چپ: نشانگر (Standard Molecular Marker 100bp DNA Ladder) جدایه *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* (کنترل منفی) جدایه‌های P21, A41, Q101, Q91, Q71, A51, P3, A11, A2, Q61, P11



شکل ۴- نقوش الکتروفورزی محصول rep-PCR با آغازگر اختصاصی ERIC 1R/ERIC 2 از راست به چپ: نشانگر (Standard Molecular Marker 100bp DNA Ladder) جدایه *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* (کنترل منفی) جدایه‌های P11, A2, Q61, A11, Q101, P21, A41, Q91, P3, A51, Q71

و A2 در یک گروه مستقل قرار گرفتند. تلفیق داده‌های به‌دست آمده از واکنش rep-PCR با هر سه آغازگر قید شده نیز دو گروه با تشابه ۹۱٪ نشان داد، که در این‌جا نیز سه جدایه به‌دست آمده از باجگاه در یک گروه مستقل قرار گرفتند و جدایه A51 به‌صورت یک شاخه مستقل از گروه اول با ۹۸٪ تشابه قرار گرفت (شکل ۶).

اثبات بیماری‌زایی روی نهال‌های سیب، به و گلابی
یازده جدایه نماینده که از لحاظ خصوصیات فنوتیپی و آزمون PCR به‌عنوان *E. amylovora* شناسایی شدند (Q71, Q61, Q91, Q101, A11, A2, A41, A51, P11, P21, P3) جهت انجام این آزمون روی سه میزبان

شد که سه جدایه A2, Q61 و P11 که از منطقه باجگاه به‌دست آمده بود یک گروه مجزا را نسبت به سایر جدایه‌ها تشکیل دادند. همچنین، دندروگرام رسم شده برای نقوش الکتروفورزی محصول rep-PCR با استفاده از آغازگر REP 1R/REP 2I دو گروه با شباهت ۹۲٪ نشان داد، دو جدایه Q61 و P11 که از منطقه باجگاه به‌دست آمده بود یک گروه مجزا را نسبت به سایر جدایه‌ها تشکیل دادند، جدایه A51 به‌صورت یک شاخه مستقل از گروه اول با بیش از ۹۳٪ تشابه قرار گرفت. به‌علاوه، دندروگرام رسم شده برای نقوش الکتروفورزی محصول rep-PCR با استفاده از آغازگر BOX A1R دو گروه با تشابه ۸۶٪ بین اعضا نشان داد که سه جدایه P11, Q61

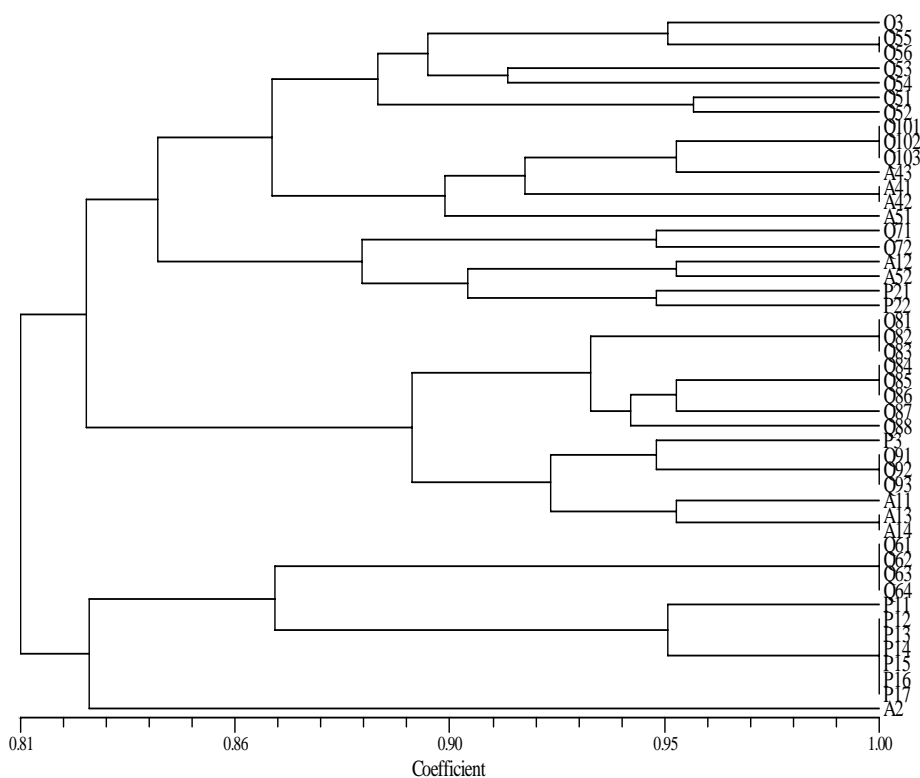
لکه‌های قهوه‌ای تا سیاه در اطراف ناحیه مایه‌زنی شده گردید در حالی‌که این ناحیه در میوه شاهد، تنها تا حدودی نکروز و سیاه گردید.

جدول ۳- نتایج آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های *Erwinia amylovora* جدا شده از مناطق مختلف شیراز

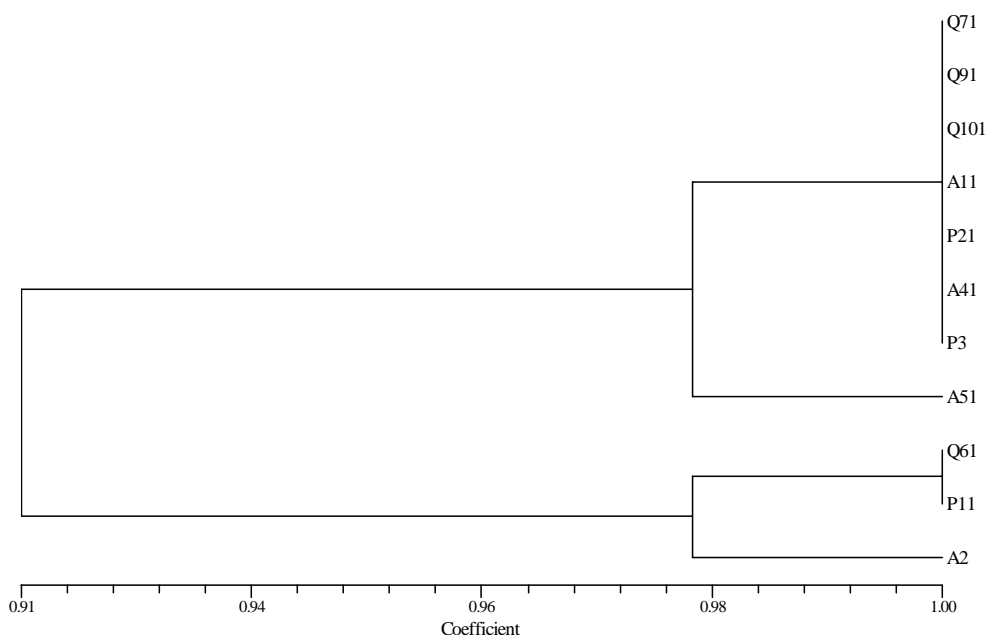
جدایه مایه‌زنی شده	علائم خشکیدگی برگ و قهوه‌ای شدن رگ‌برگ			علائم سرعصایی شدن دم‌برگ		
	سیب	به	گل‌ابی	سیب	به	گل‌ابی
Q61	-	+	-	-	+	-
Q71	-	+	-	-	+	-
Q91	-	+	-	-	+	-
Q101	-	+	+	+	+	-
A11	-	-	+	-	-	+
A2	-	+	+	-	+	+
A41	-	+	+	-	+	+
A51	-	+	+	-	+	+
P11	+	+	-	+	+	-
P21	+	+	-	+	+	-
P3	+	-	-	+	-	-

سیب، به و گل‌ابی مورد استفاده قرار گرفت. هر جدایه علی‌رغم این‌که از چه میزبانی جداسازی شده بود به هر سه میزبان مایه‌زنی شد. تمام جدایه‌های مورد بررسی در این روش، هر دو علائم خشکیدگی برگ‌ها و عصایی شدن دم‌برگ را در گیاهان مایه‌زنی شده ایجاد کردند. از میان جدایه‌های به‌دست آمده از به تنها جدایه Q101 که از به چمران جدا شده بود هر دو علائم را علاوه بر به در گل‌ابی نیز ایجاد کرد، همچنین جدایه A11 که از سیب چمران جدا شده بود تنها جدایه به‌دست آمده از سیب بود که این علائم را تنها در سیب ایجاد کرد، سایر جدایه‌های به‌دست آمده از سیب علاوه بر سیب در به نیز هر دو علائم را ایجاد کردند. جدایه P3 نیز تنها جدایه جدا شده از گل‌ابی بود که فقط در گل‌ابی ایجاد علائم کرد، سایر جدایه‌های به‌دست آمده از گل‌ابی علاوه بر گل‌ابی در به نیز ایجاد آلودگی کردند (جدول ۳).

همچنین یازده جدایه نماینده فوق برای انجام آزمون اثبات بیماری‌زایی روی میوه نارس گل‌ابی مورد استفاده قرار گرفت و پس از گذشت حدود پنج روز موجب بروز



شکل ۵- دندروگرام ویژگی‌های فنوتیپی ۴۷ استرین باکتری *Erwinia amylovora* از میزبان‌های مختلف (Rohlf, 2000). مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ نوشته شده‌است.



شکل ۶- دندروگرام تلفیق نقوش الکتروفورز محصول rep-PCR باکتری *Erwinia amylovora* با سه آغازگر ERIC 1R/ERIC REP، BOX A1R و 1R/REP 2I ویژگی‌های استرین‌ها در جدول ۱ نوشته شده است.

بیماری درصد آلودگی درختان به حدی بالا بود که به نظر می‌رسید کل درخت در آتش سوخته و خشک شده است. این مورد بالاخص در نمونه‌برداری به عمل آمده از باغات منطقه چمران به چشم می‌خورد.

از بافت‌های آلوده جدایه‌ای از باکتری گرم منفی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و بی‌هوازی اختیاری جدا شد که بر اساس نتایج حاصل از انجام آزمون‌های استاندارد باکتری‌شناسی به‌عنوان *E. amylovora* تشخیص داده شد (Schaad et al., 2001).

جدایه‌ها از لحاظ خصوصیات فنوتیپی تنوعی نشان ندادند و تنها در برخی خصوصیات از قبیل تولید گاز از گلوکز، تولید اندول، تولید رنگدانه متالیک روی محیط کشت EMB و تولید اسید از آدونیتول، آرابینوز، آرابیتول، اتانول، دولسیتول، زایلوز، سلوبیوز و نشاسته واکنش‌های متفاوتی داشتند.

با توجه به آنالیز عددی ویژگی‌های فنوتیپی ۴۷ جدایه به‌دست آمده از میزبان‌های مختلف گروه‌هایی با شباهت بیش از ۸۲٪ درصد ایجاد شد، که تمام جدایه‌های به‌دست آمده از یک میزبان و اکثر جدایه‌های مربوط به یک منطقه در یک گروه قرار گرفتند. جدایه A2 که از سیب منطقه باجگاه به‌دست آمده بود به‌صورت یک شاخه مستقل با ۸۲/۶٪ تشابه با سایر جدایه‌ها قرار

با استفاده از نرم افزار Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis system (Ntsys-pc version 2.02) فاصله ژنتیکی جدایه‌ها رسم گردید. فاصله یا شباهت ژنتیکی بین افراد بر اساس مارکرهای ملکولی، به صورت وجود یا عدم وجود نوار در ژل تعیین شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش مراتبی (Hierarchical Technique) انجام و برای بررسی فاصله واقعی میان کلاسترها از روش Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Average (UPGMA) و ضریب تشابه Simple matching استفاده گردید. استفاده از این روش نسبت به روش‌های دیگر متداول تر است زیرا خصوصیات همه اعضای مربوط به دو کلاستر را پوشش می‌دهد (Rohlf, 2000).

بحث

طی بازدیدهای به‌عمل آمده از باغات میوه مناطق مختلف شیراز (از اواخر فروردین ماه ۱۳۸۵ تا شهریور ماه ۱۳۸۶) علائم سوختگی آتشی درختان میوه دانه‌دار با شدت متفاوت مشاهده شد. این علائم شامل خشکیدگی شکوفه‌ها، قهوه‌ای شدن رگبرگ‌ها و بافت اطراف آن، آویزان شدن برگ‌ها و میوه‌های نارس و بروز شانکر و ترشحات صمغی در تنه درختان بود که با پیشرفت

پلاسمید مذکور اطلاعات مربوط به متابولیسم تیمین را حمل کرده و به طور اختصاصی در تمام جدایه‌های این باکتری وجود دارد (Laurent *et al.*, 1989; Bereswill *et al.*, 1992) با توجه به منابع موجود و مطالعات انجام شده از لحاظ اندازه قطعه تکثیر شده با آغازگر مذکور (با توجه به تعداد توالی‌های تکراری ۸ جفت بازی در یک قطعه) قطعه تکثیر شده بین ۹۰۰ تا ۱۱۰۰ جفت بازی قابل قبول می‌باشد و آغازگرهای A/B اختصاصی *E. amylovora* بوده و با DNA هیچ یک از گونه‌های نزدیک تکثیر صورت نمی‌گیرد (Bereswill *et al.*, 1992; Lecomte *et al.*, 1997).

با توجه به نقوش حاصل از واکنش rep-PCR، و تشابه بالای جدایه‌ها (بیش از ۹۰٪) و عدم وجود تفاوت معنی‌دار در بین جدایه‌ها می‌توان نتیجه گرفت که جدایه‌های مختلف *E. amylovora* با توجه به تنوع میزبانی از لحاظ خصوصیات ژنوتیپی براساس rep-PCR و آغازگرهای REP، ERIC و BOX تنوع بسیار پائینی دارند و همگن می‌باشند (McManus & Jones 1995; Rico *et al.*, 2008).

تنوع پائین جدایه‌های مختلف این باکتری به کمک روش‌های بیوشیمیایی (Dye, 1968; Verdonck *et al.*, 1987) سرولوژی (Vantomme *et al.*, 1982) و مطالعات دورگ‌گیری DNA (Brenner *et al.*, 1974) و مطالعات Plused field gel electrophoresis Zhang & Geiderl (1997) نشان داده شده است. یکنواختی فنوتیپی و ژنوتیپی در بین جدایه‌های مختلف یک گونه، به تخصص و دامنه میزبانی باکتری، همچنین به منشأ جغرافیایی آن‌ها بستگی دارد. گونه‌هایی مثل *E. amylovora* که تنها در گیاهان خانواده رزاسه بیماری‌زا می‌باشد، به‌طور قابل ملاحظه‌ای هموزن (همگن) هستند. احتمالاً به این دلیل که فشار تکاملی کمتری را متحمل شده‌اند (Perombelon & Kelman, 1980). با توجه به یکنواختی فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های *E. amylovora* که از میزبان‌های مختلف در مناطق مختلف شیراز به دست آمده‌بود، این احتمال وجود دارد که تمام جدایه‌های این باکتری از یک منشأ سرچشمه گرفته‌اند و سپس به‌وسیله نهال‌های آلوده در سرتاسر ایران پراکنده شده‌اند (Schroth *et al.*, 1974).

گرفت، این جدایه تنها جدایه‌ای بود که توانایی تولید اندول را داشت همچنین قادر به ایجاد رنگدانه سبز متالیک روی محیط EMB بود اما قابلیت تصاعد گاز از گلوکز را نداشت. سایر تفاوت‌های موجود در بین جدایه‌ها ناشی از اختلافات ناچیز تغذیه‌ای بود.

در آزمون اثبات بیماری‌زایی، کلیه گیاهان مایه‌زنی شده هر دو علائم خشکیدگی و تغییر رنگ برگ‌ها و عصایی شدن دم‌برگ‌ها را نشان دادند. جدایه‌های به دست آمده از یک میزبان، به‌خصوص روی همان میزبان بیماری‌زا بودند، جدایه Q101 که از به جدا شده بود علاوه بر به روی گلابی نیز بیماری‌زا بود، همچنین سه جدایه A2، A41 و A51 که از سیب جدا شده بودند، علاوه بر سیب روی به نیز بیماری‌زا بودند، دو جدایه P11 و P21 که از گلابی به‌دست آمده بودند نیز علاوه بر گلابی روی به بیماری‌زا بودند. با توجه به نتایج به‌دست آمده بر اساس این آزمون مشخص شد که تمامی جدایه‌ها بدون توجه به اینکه از چه میزبانی جدا شده‌اند قادر به ایجاد بیماری در به می‌باشند و از نظر بیماری‌زایی تفاوتی ندارند.

همچنین آزمایشات انجام شده بوسیله Rosen & Groves (1928) نشان داد که آلودگی نهال‌های به ژاپنی (*Chaenomeles lagenaria*) در آزمایشگاه بیش از سایر میزبان‌های متعلق به زیر خانواده *Maloideae* می‌باشد (Vannest, 2000).

در آزمون اثبات بیماری‌زایی از طریق مایه‌زنی میوه نارس گلابی کلیه میوه‌های مایه‌زنی شده علائم تغییر رنگ را با تأخیر زمانی کمی نسبت به هم طی پنج روز نشان دادند. با توجه به نتایج حاصل از این آزمون کلیه جدایه‌های مایه‌زنی شده از لحاظ بیماری‌زایی کاملاً مشابه بودند و هیچ گونه تنوعی از لحاظ بیماری‌زایی نشان ندادند.

در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از آغازگر اختصاصی A/B (Bereswill *et al.*, 1992) که براساس پلاسمید pEA29 طراحی شده‌است استفاده شد. چهل و هفت جدایه که براساس خصوصیات فنوتیپی به عنوان *E. amylovora* تشخیص داده شده بود در این واکنش قطعه حدود ۱۰۰۰ جفت بازی را تکثیر کردند که صحت وجود پلاسمید pEA29 را در این جدایه‌ها ثابت می‌کند.

REFERENCES

1. Ashkan, S. M. (2006). *A textbook of fruit crop diseases in Iran*. Aeeizh, Tehran. (In Farsi).
2. Mazarei, M., Hasanzadeh, N. & Hajimorad, M. R. (1993). Serological identification of *Erwinia amylovora* causal agent of fire blight disease. In: *Proceedings of the 11th Iranian Plant Protection Congress*, 28 Aug-2 Sept., University of Guilan, Rasht, Iran, p. 223.
3. Zakeri, Z. & Sharifnabi, B. (1991). Fire blight of pear in Karaj. In: *Proceedings of the 10th Iran. Plant Protection Congress*. 1-5 Sept., University of Shahid Bahonar, Kerman, Iran. p. 157.
4. Sahandpour, A. & Ghasemi, A. (2004). Incidence of fire blight in Fars province. In: *Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress*, 28Aug- 1 Sept., Tabriz University, Tabriz, Iran, p. 429.
5. Mazarei, M., Zakeri, Z. & Hasanzadeh, N. (1994). The status of fire blight disease of pome fruits in West Azarbayejan province and Ghazvin in 1991-1992. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 30, 25-32. (In Farsi).
6. Afunian, M. R. & Rahimian, H. (1996). Investigation on the characteristics of Iranian isolates of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 411, 187-188.
7. Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W. & Geider, K. (1992). Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by PCR analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3522-3526.
8. Brenner, D. J., Fanning, G. R. & Steigerwalt, A. G. (1974). Deoxyribonucleic acid relatedness among *Erwiniae* and other *Enterobacteriaceae*: the gall, wilt, and dry-necrosis organisms (Genus *Erwinia* Wnslow *et al.*, *sensu stricto*). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 24, 197-204.
9. Dye, D. W. (1968). A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The amylovora group. *New Zealand Journal of Science*, 11, 590-607.
10. Fahy, P. C. & Persley, C. J. (1983). *Plant Bacterial Diseases: A Diagnostic Guid*. Academic Press. Sydney, Australia.
11. Hugh, R. & Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 66, 24-26.
12. Klement, Z., Farkas, G. L. & Lovrekovich, L. (1964). Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology*, 54, 474-477.
13. Laurent, J., Barny, M. A., Kotoujansky, A., Dufriche, P. & Vannest, J. L. (1989). Characterization of an ubiquitous plasmid in *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2, 160-164.
14. Lecomte, P., Manceau, C., Paulin, J. P. & Keck, M. (1997). Identification by PCR analysis on plasmid pEA29 of isolates of *Erwinia amylovora* responsible of an outbreak in Central Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 91-98.
15. McManus, P. S. & Jones, A. L. (1995). Genetic fingerprinting of *Erwinia amylovora* strains isolated from tree-fruit crops and *Rubus* spp. *Phytopathology*, 85, 1547-1553.
16. Perombelon, M. C. M. & Kelman, A. (1980). Ecology of the soft rot erwinias. *Annual Review of Phytopathology*, 18, 361-387.
17. Rico, A., Elena Fuhrer, M., Ortiz-Barredo, A. & Murillo, J. (2008). Polymerase chain reaction fingerprinting of *Erwinia amylovora* has a limited phylogenetic value but allows the design of highly specific molecular markers. *Phytopathology*, 98, 260-269.
18. Rohlf, F. J. (2000). NTSYSpc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1 Exete software. *Applied Biostatistics INC.*, NY, USA. 493-505.
19. Ritchie, D. F. & Klos, E. J. (1974). A laboratory method of testing pathogenicity of suspected *Erwinia amylovora* isolates. *Plant Disease Reporter*, 58, 181-183.
20. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
21. Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press, St. Paul, MN., USA.
22. Schroth, M. N., Thomson, S. V., Hildebrand, D. C. & Moller, W. J. (1974). Epidemiology and control of fire blight. *Annual Review of Phytopathology*, 12, 389-412.
23. Vander Zwet, T. & Bonn, W. G. (1999). Recent spread and current worldwide distribution of fire blight. *Acta Horticulturae*, 489, 167-168.
24. Vander Zwet, T. & Keil, H. L. (1979). Fire blight, A bacterial disease of roseous plants. *Acta Horticulturae*, 338, 29-31.
25. Vannest, J. L. (2000). *Fire blight, The disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, New York. .
26. Vantomme, R., Swings, J., Goor, M., Kersters, K. & De ley, J. (1982). Phytopathological, serological, biochemical and protein electrophoretic characterization of *Erwinia amylovora* strains isolated in Belgium. *Phytopathology Zeitschrift*, 103, 349-360.

27. Verdonck, L., Mergaert, J., Rickaert, C., Swiings, J., Kersters, K. & De ley, J. (1987). The genus *Erwinia*: a numerical analysis of phenotypic features. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 4-18.
28. Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genome. *Nucleic Acid Research*, 19, 6823-6831.
29. Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. J. & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods of Molecular and Cellular Biology*, 5, 25-40.
30. Zhang, Y. & Geider, K. (1997). Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4421-4426